

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

NACHWEIS UND BEKAEMPfung
VON KONTAMINATIONEN MIT MYKOPLASMEN
IN ZELLKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Hansueli Sturzenegger
Tierarzt
von Reute/AR

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. H.U. Bertschinger, Korreferent

Rieker + Amman AG Druck, Glatthbrugg
Zürich 1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

NACHWEIS UND BEKAEMPfung
VON KONTAMINATIONEN MIT MYKOPLASMEN
IN ZELLKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Hansueli Sturzenegger
Tierarzt
von Reute/AR

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. H.U. Bertschinger, Korreferent

Rieker + Amman AG Druck, Glattbrugg
Zürich 1982



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG	1
1.1. Vorkommen	1
1.2. Infektionsquellen	1
1.3. Durch Mykoplasmen an Zellen verursachte Schäden	2
1.4. Bekämpfung und Prophylaxe	3
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1. Material	4
2.1.1. Mykoplasmen	4
2.1.2. Nährmedium für Mykoplasmen	4
2.1.3. Zellen	5
2.1.4. Zell-Medien	5
2.2. Methoden	6
2.2.1. Bestimmung der MIC	6
2.2.2. Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen	7
2.2.3. Elimination von Kontaminationen mit Mykoplasmen aus Zellkulturen (kurz Zelldekontaminationen genannt)	9
3. ERGEBNISSE	11
3.1. Quantitative Bestimmung der Mykoplasmen	11
3.2. Wachstumskurven von <i>A.laidlawii</i> und <i>M.hyorhynis</i>	12
3.3. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) verschiedener Hemmstoffe gegenüber <i>A.laidlawii</i> und <i>M.hyorhynis</i>	13
3.4. Lässt sich mit Econazol die Hemmwirkung von Antibiotika gegenüber Mykoplasmen verstärken ?	13
3.5. Bekämpfung von Mykoplasmen als Kontaminanten in Zellkulturen	14

	Seite
3.5.1. Bestimmung des Ausmasses der Kontamination mit Mykoplasmen in Zellkulturen	15
3.5.2. Versuche zur Elimination von Kontaminationen mit Mykoplasmen in Zellkulturen mittels Kombination von Econazol und Antibiotika	16
3.5.3. Dekontaminationen von HeLa-Zellkulturen mittels Makrophagen allein und in Kombination mit Antibiotika	18
3.5.4. Elimination von Mykoplasmen aus Zellkulturen mittels 5-Bromourazil und Hoechstfarbstoff Nr. 33258	18
3.6. Versuche, die Mykoplasmen von der Zelloberfläche zu lösen und dann mit Hemmstoffen zu eliminieren	20
3.6.1. Elimination von Mykoplasmen aus einer HeLa-Zellkultur mittels Berol	20
3.6.2. Versuche zur Elimination von Mykoplasmen aus HeLa-Zellkulturen durch Loslösung von der Zelle mit Neuraminidase und anschliessender Antibiotikabehandlung	21
4. DISKUSSION	25
5. ZUSAMMENFASSUNG	31
Tabellen	32
Abbildungen	39
6. LITERATURVERZEICHNIS	44
7. VERDANKUNGEN	50
8. LEBENSLAUF	51

ABKUERZUNGEN

BHK	Baby hamster kidney
CFU	Colony forming untis
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetal calf serum
MIC	minimal inhibitory concentration
NA	Neuraminidase
OD ₅₉₅	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 595 nm
PPLO	Pleuropneumonia like organism
rpm	revolutions per minute

1. EINLEITUNG

1.1. Vorkommen

In Zellkulturen wurde eine Kontamination mit Mykoplasmen das erste Mal 1956 von Robinson et al beschrieben. In der Folge häuften sich Berichte, die zeigten, dass solche Kontaminationen von Zellkulturen weit verbreitet sind (43).

Während 13 Jahren untersuchten Barile et al und Del Giudice und Hopps 17'000 Zellkulturen auf Mykoplasmen. Davon waren 2'800 kontaminiert. Aus 8% dieser Kulturen konnten sie 2 oder mehr Mykoplasmenspezies isolieren, beim Rest (92%) handelte es sich um eine Monoinfektion.

45% der nachgewiesenen Keime erwiesen sich als bovine Typen, nämlich *M.arginini*, *A.laidlawii*, *M.bovis*. Am zweithäufigsten traten humane Typen auf: *M. orale* (823 Stämme, 30%), *M. fermentans* und *M. buccale*. 581 Stämme (21%) wurden als *M. hyorhinae* (Schwein) klassifiziert. Allgemein gilt, dass je höher die Zahl der Passagen ist, desto grösser ist auch das Risiko einer Mykoplasmeninfektion.

Während kontinuierliche Zelllinien häufig mit Mykoplasmen kontaminiert sind (50-95%), ist eine Kontamination bei primären Zellen selten (0-4%). Es gelang Barile et al. 1973 aus 3200 untersuchten primären Zellkulturen nur in 42 Fällen (~1%), Mykoplasmen nachzuweisen.

1.2. Infektionsquellen

Wie oben erwähnt, sind beinahe 50% der Mykoplasmenspezies bovinen Ursprungs. Da für das Wachstum der Zellen bovines Serum verwendet wird, liegt die Annahme nahe, dass dieses die Quelle der Kontamination darstellt. Barile und Kern untersuchten 1971 888 bovine Serumproben vor der Verar-

beutung. Aus 285 Proben (rund 1/3) konnten sie Mykoplasmen isolieren, wobei es sich um die gleichen Keime handelte, wie sie in Zellkulturen nachzuweisen waren. 8 mal fand sich auch M.hyorhinitis. Bovines Serum und Trypsin gelten demnach als mögliche Quellen der Verunreinigung. Von Menschen, die Zellkulturen betreuen, gehen Kontaminationen mit M. orale aus. Besonders gefährlich ist in dieser Hinsicht das Pipettieren mit dem Mund. Nicht ausser acht zu lassen ist auch die laborinterne Uebertragung von Kontaminationen beim Hantieren mit verschiedenen Zellkulturen.

1.3. Durch Mykoplasmen an Zellen verursachte Schäden

Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen sind oft so diskret, dass weder das Zellwachstum noch die Morphologie stark verändert sind. Nur mit speziellen Nachweismethoden lassen sie sich feststellen. Obschon spektakuläre Veränderungen fehlen, verfälschen doch Verunreinigungen mit Mykoplasmen Ergebnisse von Versuchen, welche mit Zellkulturen durchgeführt werden. So kann die Zell-DNA-Synthese herabgesetzt, die Antigenität der Zelloberfläche verändert und Virusproduktion des Zellrasens erniedrigt sein (14). Harley et al (3) zeigten, dass der Metabolismus der befallenen Zelle beeinträchtigt wird, indem die r-RNA kontaminierter Zellen ein anderes Verteilungsmuster aufwies. Die Zellfusion bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern kann gestört sein (Hybridoma Techniques, EMBO, SKMB Course 1980, Basel. Seite 61). Verschiedene Autoren beschrieben zytopathische Effekte (27) und chromosomale Aberrationen (10,28,42) als Folge von Mykoplasmenkontaminationen. Auch Rezeptorblockaden auf der Zelloberfläche für Viren, Hormone und andere rezeptorabhängige Partikel und Substanzen könnten als Folge von Mykoplasmeninfektionen auftreten.

1.4. Bekämpfung und Prophylaxe

Die Methoden der Bekämpfung von Mykoplasmenkontaminationen in Zellkulturen sind unbefriedigend. Es ist zwar möglich, Mykoplasmen in vitro mit Antibiotika (20,45,25,26) oder anderen Substanzen (4,8) zu inaktivieren. Doch blieben die meisten Versuche, Zellkulturen von Mykoplasmen zu befreien, erfolglos (25,38,23,35). Jasutaku Niitu (26) beschrieb Resistenzentwicklungen von *M.pneumoniae* gegenüber Erythromycin sowie Kreuzresistenzen von Makrolid-Antibiotika und Lincomycin. Der Zellkontakt scheint den Mykoplasmen einen gewissen Schutz gegenüber Hemmstoffen zu gewähren. Nègre (25) konnte mit Tetrazyklin und Kanamycin die Mykoplasmen aus dem Ueberstand von Zellkulturen eliminieren, nicht aber die Zellen selbst von Mykoplasmen befreien.

Zweck der vorliegenden Arbeit war es:

1. Die minimale Hemmkonzentration (Minimal inhibitory concentration) verschiedener Hemmstoffe gegenüber Mykoplasmen in vitro zu bestimmen.
2. Einen eventuellen Synergismus von Econazol und von Antibiotika mit bekannter Hemmwirkung gegen Mykoplasmen nachzuweisen.
3. Verschiedene Methoden zur Elimination von Mykoplasmen aus Zellkulturen zu vergleichen und durch Kombination der Verfahren eine erhöhte Erfolgsrate zu erzielen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Mykoplasmen

Für die Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika an Mykoplasmen verwendeten wir *Acholeplasma laidlawii* PG8 und *Mykoplasma hyorhinis* BTS 7. Diese beiden Stämme wurden uns von Herrn Prof. Nicolet, Bern, zur Verfügung gestellt. Die Mykoplasmenstocksuspensionen enthielten 69×10^6 CFU/ml für *A.laidlawii* resp. 77×10^6 CFU/ml für *M.hyorhinis*. Die Lagerung erfolgte in PPLO Bouillon bei -70°C .

2.1.2. Nährmedium für Mykoplasmen

Als flüssiges Nährmedium für die Mykoplasmen diente PPLO-Bouillon. Dazu wurden 210 ml H_2O bidest, 4,5 g PPLO Broth Base (Art No 011458, Becton Dickinson) und 3,0 g Dextrose gelöst, anschliessend 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 30 ml Hefe 25% (Art No 3753, Merck, Darmstadt, BRD) und 60 ml Pferdeserum (North American Biological Institute, Miami, Florida) zugegeben.

Als festen Nährboden verwendeten wir PPLO-Agar, der wie folgt hergestellt wurde:

in 500 ml H_2O bidest wurden 17 g Agar Base (Art No 011456, Becton Dickinson, Basel) unter stetem Mischen und Aufkochen gelöst und dann autoklaviert. Nachdem das Medium auf 48°C abgekühlt war, fügten wir 133 ml Pferdeserum und 66 ml Hefe 25% zu. Je 5 ml wurden in Gewebekulturschalen (Art No 25011, 60 x 15 mm, steril, mit Netzeinteilung, Corning) gegossen und diese bei 4°C in Plastikschrallen verschlossen nicht länger als 3 Wochen aufbewahrt.

2.1.3. Zellen

Mykoplasmenfreie Zellen wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, bezogen. Es handelte sich um HeLa-Zellen CCI₂ von einem epitheloiden Carcinom der Cervix gewonnen, Passagen 100 - 125. Mykoplasmen-kontaminierte Zellen waren im Institut vorhanden. Es handelte sich um HeLa-Zellen Passagen 76 - 131 und BHK Passagen 222 - 243.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (Falcon Plastics, Los Angeles, California) gezüchtet und zweimal wöchentlich passiert. Zu diesem Zweck wurden die Monolayerkulturen mit PBS-A (phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca- und Mg-Ionen nach Dulbeco (29)) gewaschen und mit einigen ml ATV [8,0 g NaCl, 0,2 KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,25 g Trypsin (Difco, 1:250) und 0,25 g Versen (Titriplex III, Merck) ad 1000.0 ml Aqua bidest] überschichtet. Das ATV wurde danach sofort dekantiert und die Zellen mit maximal 1 ml ATV bei 37°C inkubiert. Unter mikro- und makroskopischer Beobachtung wurde die vollständige Zellablösung abgewartet, die Zellen anschliessend in 8 ml Wachstumsmedium aufgenommen, davon je 2 ml in eine neue 75 cm² Flasche ausgesät und zusätzlich 18 ml Wachstumsmedium zugegeben.

2.1.4. Zell-Medien

Als Nährmedium für die Zellen diente Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM) (Gibco Bio-Cult, Glasgow, Scotland) gepuffert mit 30 mM Hepes (SERVA Feinbiochemie, Heidelberg) und mit 100 IE/ml Penicillin NOVO, 100 µg/ml Streptomycin NOVO (NOVO Industri A/S, Kopenhagen, Dänemark) sowie 10% bzw. 2% fötalem Kälberserum (Gibco Bio-Cult, Glasgow, Scotland), je nach Verwendung als Wachstums- bzw. Erhaltungsmedium.

2.2. Methoden

2.2.1. Bestimmung der MIC

Die Mykoplasmenstocksuspension wurde bis ca. $1,8 \times 10^6$ CFU/ml verdünnt und davon 1 ml in 5 ml Glasfläschchen mit Schraubdeckel (Bijoux-bottles) abgefüllt. Danach wurde die entsprechende Hemmstoffkonzentration zugegeben und das Gemisch bei 37°C 69 Stunden inkubiert.

Um das Wachstum der Mykoplasmen zu unterbrechen, wurden die Bijouxfläschchen in Eis gestellt und im Kühlraum (4°C) bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Um die Mykoplasmen zu quantifizieren, verwendeten wir die Proteinnachweismethode (2), die darauf beruht, dass die nach Vermehrung der Mykoplasmen entstehende Erhöhung der Proteinkonzentration gemessen wird. Zu diesem Zwecke wurden 0,4 ml PPLO-Bouillon, in der sich *M. hyorhinis* vermehrt hatte (bei *A. laidlawii* 0,2 ml), in Mikroprobenröhrchen (PPR 15, Milian SA, Genf) gegossen, mit PBS-A auf 1,0 ml aufgefüllt und danach 8 Minuten lang in der Eppendorf-Zentrifuge (12'000 rpm, 9'980 g) zentrifugiert. Der Ueberstand wurde abgesaugt, 1 ml PBS-A zugegeben und die Mikroprobenröhrchen 1 Minute lang auf dem Orbital-Shaker (Lab-Shaker, A. Kühner, Basel) bei 150 rpm geschüttelt. Nach Zentrifugation während 6 Minuten wurde der Ueberstand wieder abgesaugt, 1 ml H_2O zugegeben und die Gefässe während 45 Min. auf den Shaker gebracht, um das Protein in Lösung zu bringen. Um im linearen Bereich der Eichkurve zu bleiben entnahmen wir je nach der erwarteten Proteinkonzentration 0.2 - 0.8 ml dieser Lösung, füllten sie in Wegwerfcuvetten (Art No 67.742, Sarstedt AG, Seevelen, CH) und ergänzten wenn nötig mit H_2O bidest auf 0,8 ml.

Nach der Zugabe des Reagens (Bio Rad protein assay reagent, BIO RAD Laboratories, Richmond, USA) wurde die Lösung gut

gemischt, 5 Min. stehen gelassen und nochmals gemischt. Im Absorptionsmessgerät Uvicon 800 (Kontron AG, Zürich) wurde die an Protein gebundene Farbe bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und auf 0,8 ml umgerechnet. Von jedem Bijouxfläschchen wurden zusätzlich je 20 µl der Mykoplasmasuspension auf zwei Agarschälchen gebracht und während 5 Tagen bei 37°C unter aeroben und anaeroben Verhältnissen (Gaspack, Becton Dickinson, Basel) inkubiert. War kein Wachstum festzustellen, so wurden die entsprechenden Schälchen weitere 5 Tage inkubiert.

2.2.2. Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen

Der Nachweis erfolgte mit 2 Methoden.

1. Mit einem biochemischen Nachweisverfahren. Eingesetzt wurde der Hoechstfarbstoff Nr. 33258, der sich speziell an die DNA bindet (3). 33258 wurde in PBS-A pH 7,0 gelöst, als Stocklösung (30 µg/ml) bei -20°C gelagert, und für den Gebrauch auf 2,5 µg/ml verdünnt.

Die zu kontrollierenden Zellen wurden zuerst mit Trypsin von der Unterlage abgelöst und in neues Medium aufgenommen. Anschliessend säte man je 1 ml (50-100'000 Zellen/ml) in eine Delle einer 24 Lochplatte (Tissue culture cluster Nr. 3524, Costar Cambridge USA). Die Dellen enthielten ein in Aceton-Alkohol (1:1) gewaschenes, mit einem sauberen Leinenlappen getrocknetes, autoklaviertes, steril mit einer Pinzette plaziertes Deckgläschen. Nachdem alle Dellen mit Zellen beschichtet waren, wurde bei 37°C in einer feuchten Kammer ca 24h. inkubiert.

Für die Beurteilung der Zellen ist es wichtig, dass der Monolayer nicht vollständig ausgewachsen ist (mikroskopische Kontrolle).

Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte in den Dellen der Costarplatte nach folgendem Prozedere: ohne den Ueberstand abzugießen wurde 1 ml Fixativ (Methanol 100% : Eisessig (1:1)) zugegeben, der Ueberstand nach 2 Minuten dekantiert und die Zellen erneut mit ca. 3 ml Fixativ überschichtet.

Nach 5 Minuten wurde dieser Vorgang wiederholt und nach Ablauf der letzten 5 Minuten der Ueberstand dekantiert. Die Deckgläschen wurden aufgestellt und getrocknet.

Konnte die Auswertung dieser Monolayer nicht direkt vorgenommen werden, wurden die Deckgläschen bei -20°C gelagert. Bevor wir die Zellen mit ca. 1-2 ml Hoechstfarbstoff Nr. 33258 überschichteten, wurde dieser auf $25-30^{\circ}\text{C}$ aufgewärmt. Während 6 Minuten konnte der Farbstoff auf die mit einem schwarzen Glas vor Licht geschützten Zellen einwirken. Die Deckgläschen wurden dann mit bidest. Wasser 2 mal gespült und, Monolayer nach unten, mit einem Tropfen gepufferten Glycerins (phosphate buffered saline (PBS) pH 7,0) : Glycerin = 2:8) versehen, auf einen Objektträger gebracht.

Nach 10 Minuten wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Ortholux II mit Auflichtilluminator Ploemopak 2.2) beurteilt. Das Filtersystem B_2 mit einem Anregungsbereich UV und violett sperrte das Licht unter 350 nm und oberhalb 410 nm. 200 - 250 Zellen, verteilt über das ganze Deckgläschen, wurden ausgezählt und die Mykoplasmen-positiven Zellen registriert.

2. Kultureller Nachweis. Kulturell sollen Mykoplasmen am besten zwischen dem 1. und 6. Tag nach der Zellpassage nachzuweisen sein (31). Am 2., 3. Tag nach der Passage wurde deshalb vom Zellüberstand je 20 μl auf 3 verschiedene Agarplättchen (Durchmesser 30 mm) übertragen und mit einem Drigalskispatel gleichmässig auf der Agaroberfläche

verteilt. Diese Plättchen wurden 5 Tage im Anaerobentopf bei 37°C inkubiert. Die Agaroberfläche wurde mit der Stereolupe auf Mykoplasmenkolonien abgesucht (Stereolupe Wild, Vergrößerung 600 x, mit Durchlicht). Waren keine Kolonien festzustellen, wurden die Plättchen weitere 5 Tage inkubiert und dann auf die Präsenz von Mykoplasmenkolonien abgesucht.

2.2.3. Elimination von Kontaminationen mit Mykoplasmen aus Zellkulturen (kurz Zelldekontaminationen genannt)

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde versucht, mit verschiedenen, zum Teil in der Literatur beschriebenen Methoden, Zellkulturen von der Mykoplasmenkontamination zu befreien.

Es wurden folgende Methoden verglichen:

- Elimination mittels

- a Antibiotika allein und in Kombination mit Econazol
- b Makrophagen
- c Makrophagen kombiniert mit Antibiotika
- d 5-Brom-urazil und Hoechstfarbstoff Nr. 33258
- e Berol
- f Neuraminidase + Antibiotika kombiniert mit Econazol

ad a) Elimination mit Antibiotika.

Die Zellen wurden abtrypsiniert und in Medium ohne fötales Kälberserum aufgenommen. 5 ml (150'000 Zellen/ml) einer Zellsuspension wurden in Zellkulturfläschchen (Falcon 25 cm² Wachstumsfläche) ausgesät und der Hemmstoff zugegeben. Damit die Zellen nicht gleich auf der Unterlage hafteten, wurden die Fläschchen während 90 Minuten bei 37°C auf den Orbitalshaker (50 rpm) gebracht, und erst danach wurde 2% FCS zugegeben und während 3 Tagen inkubiert. Das Weiterzüchten der Zellen geschah teils unter Zugabe von Hemm-

substanzen gegen Mykoplasmen.

ad b,c,d,e) Elimination mit Makrophagen, Bromourazil und Berol.

Die Methoden, Mykoplasmen aus Zellkulturen zu eliminieren, wurden von Autoren ausführlich beschrieben (38,23,40).

ad f) Elimination mittels Lösung von Zellen mit Neuraminidase und Hemmung durch Antibiotika.

Die Zellen wurden abtrypsiniert und in E-MEM ohne foetales Kälberserum (FCS), pH 6.0 aufgenommen.

Zu 1 ml Zellsuspension (3 Mio Zellen/ml) wurden 50 Einheiten Neuraminidase (ORKD O4/O4, Behringwerke AG, Marburg) zugegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde 10 ml eisgekühltes E-MEM ohne FCS zugegeben und während 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Den Ueberstand pipettierte man ab und nahm die Zellen in 10 ml Medium mit 2% FCS auf. Nach der Aufteilung in die verschiedenen Zellkulturschälchen (Falcon, Wachstumsfläche 25 cm²) und der entsprechenden Antibiotikazugabe wurden die Zellen während 3 Tagen bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Behandlung kann nicht unmittelbar nach Abschluss einer Behandlung beurteilt werden, sondern erst nach mindestens 3 Zellpassagen. Wenn sich die Zellen dann als mykoplasmenfrei erweisen, besteht gute Aussicht, dass sie dies auch bleiben, vorausgesetzt, eine Neuinfektion wird vermieden (11).

3. ERGEBNISSE

Eliminationen von Mykoplasmen aus Zellkulturen (Dekontamination) sind schon mehrfach beschrieben worden. Es wurden dazu Antibiotika gebraucht (20,25,29), aber auch andere Hemmsubstanzen fanden Anwendung (1,4,8). Die Behandlungsmethoden befriedigten jedoch nicht völlig, die Kontamination mit Mykoplasmen liess sich entweder nur partiell oder temporär unterdrücken (15,43), oder infolge toxischer Schädigung der Zellen kam es zum Verlust der Zelllinie.

Andere Eliminationsmethoden bestanden darin, mittels geeigneter Substanzen die Mykoplasmen von der Zelloberfläche loszulösen und sie anschliessend zu lysieren (35,40). Schimmelpfeng et al (38) beschrieben, dass es ihnen gelang, mit Hilfe von Makrophagen und Antibiotika Zellkulturen zu dekontaminieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war: Die beschriebenen Methoden zur Elimination von Mykoplasmen aus Zellkulturen zu prüfen; es waren dies: die Berol-(40), die Makrophagen-(7,38) und die Hoechst-Farbstoff-Methoden (23). Weiter war die Kombination von Econazol mit bekannten, gegen Mykoplasmen wirksamen Antibiotika auf ihre Eignung zu testen, Kontaminationen mit Mykoplasmen in Zellkulturen unter Kontrolle zu halten.

3.1. Quantitative Bestimmung der Mykoplasmen

Für die in vitro Experimente suchten wir eine geeignete Methode, die uns erlaubte, Mykoplasmen zu quantifizieren. In Vorversuchen stellten wir fest, dass die in der Literatur angegebenen Verfahren (4,8,16,20,41) sich für unsere Zwecke nicht eigneten. Es wurde daher eine Proteinbestimmungsmethode ausgearbeitet (s. Methoden), die ein Mass

für die Konzentration der Mykoplasmen in verschiedenen Medien abgab.

Wie in Abb. 1 gezeigt, besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der optischen Dichte (Wellenlänge 595 nm), der Proteinlösung und der Zahl koloniebildender Einheiten. Das heisst, die Anzahl der Mykoplasmen in einem gegebenen Volumen ist der Proteinkonzentration direkt proportional. Damit konnten wir für die Quantifizierung von Mykoplasmen-suspensionen auf die zeit- und arbeitsaufwendige Kultivierung verzichten.

3.2. Wachstumskurven von A.laidlawii und M.hyorhynis

Für die Berechnung der minimalen Hemmkonzentration verschiedener Substanzen war es nötig, den Zeitpunkt des Abschlusses der logarithmischen Wachstumsphase von A.laidlawii und M.hyorhynis unter den gegebenen Bedingungen zu kennen. Wir untersuchten aus diesem Grunde das Wachstumsverhalten der beiden Keime mit Hilfe der Proteinbestimmungsmethode.

Aus Abb. 2 geht hervor, dass bei beiden Keimen nach 60 Stunden die Wachstumskurve einen Plafond erreichte. Die Vermehrungsrate gemessen vom Startinokulum bis zum Erreichen des Plafonds von M.hyorhynis (55%) war kleiner als diejenige von A.laidlawii (100%). Die Zahl der infektiösen (koloniebildenden) Einheiten (CFU = colony forming unit) pro ml betrug nach 54 Stunden Bebrütung für A.laidlawii 70 Mio CFU/ml (100%), für M.hyorhynis 48 Mio CFU/ml (68%). Dabei ergab sich wiederum eine gute Uebereinstimmung zwischen der Proteinbestimmungsmethode und der Nachweismethode für infektiöse Einheiten.

3.3. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) verschiedener Hemmstoffe gegenüber *A.laidlawii* und *M.hyorhins*

Es wurden folgende Präparate mit bekannter Aktivität gegen Mykoplasmen eingesetzt: Econazol Gentamicin, Erythromycin, Tylosin, Imazalilsulfat. Als Testkeime dienten *A.laidlawii* und *M.hyorhins*. Zur Bestimmung der MIC wurde neben dem Nachweis der Erhöhung der Proteinkonzentration auch das kulturelle Nachweisverfahren herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Aus Tabelle 1 erhellt, dass das Wachstum von *A.laidlawii* und *M.hyorhins* grosso modo mit den gleichen Konzentrationen von Hemmstoffen zu unterdrücken war. Weiter zeigt die Tabelle, dass auch in diesem Falle Proteinbestimmungsmethode und kulturelle Nachweismethode gut übereinstimmten.

3.4. Lässt sich mit Econazol die Hemmwirkung von Antibiotika gegenüber Mykoplasmen verstärken ?

Econazol besitzt eine geringgradige Hemmwirkung gegen Mykoplasmen (45). Diese Wirkung beruht wahrscheinlich wie bei den Pilzen auf einer Erhöhung der Permeabilität zellulärer Membranen, in deren Gefolge es zum Austritt von Ionen und zuletzt von Proteinen kommt (32). Da die gegen Mykoplasmen wirksamen Antibiotika ihre Wirkung als Proteinsynthesehemmer im Innern der Zelle ausüben, war es denkbar, dass mit der Erhöhung der Zellpermeabilität die Hemmstoffe leichter an ihren Wirkungsort gelangten.

Diese Experimente wurden mit *A.laidlawii* durchgeführt, indem man Antibiotika allein und in Kombination mit Econazol in vitro auf Mykoplasmen einwirken liess. Es wurde diejenige Econazolkonzentration gewählt, welche das Mykoplasmenwachstum zur Hälfte hemmte. Die Hemmwirkung wurde mit der Proteinbestimmungsmethode gemessen. Die Versuche (Tabelle 2) ergaben, dass Gentamycin, Erythromycin und Tylosin kombiniert mit Econazol 6,5 µg/ml das Mykoplasmenwachstum besser hemmten. Am eindeutigsten war die Wirkung bei Erythromycin. Erythromycin (0,055 µg/ml) ohne Econazol hatte keine hemmende Wirkung auf das Mykoplasmenwachstum, kombiniert mit Econazol 6,5 µg/ml dagegen hemmte es das Wachstum in vitro zu 90-95%. Da eine Econazolkonzentration von 6,5 µg/ml für Zellen toxisch war (die Zytotoxizitätsgrenze lag für HeLa-Zellen bei 3,0 µg/ml) wurde eine Kombination der Antibiotika mit einer für Zellen nicht mehr schädlichen Konzentration von Econazol 2,5 µg/ml vorgenommen. Bei dieser nicht zelltoxischen Konzentration von Econazol konnte aber in vitro keine synergistische Wirkung der Kombination von Econazol und Antibiotika festgestellt werden.

3.5. Bekämpfung von Mykoplasmen als Kontaminanten in Zellkulturen

Das eigentliche Ziel der Arbeit war die Elimination von Mykoplasmen in Zellkulturen. Die in vitro Versuche hatten gezeigt, dass die Hemmung des Wachstums von Mykoplasmen mit verschiedenen Antibiotika möglich war und dass mit Econazol kombiniert eine synergistische Wirkung erzielt werden konnte. Es war nun zu prüfen, ob auch an Zellen haftende Mykoplasmen mit der Kombination Antibiotika-Econazol in ihrem Wachstum zu hemmen und aus Zellkulturen zu eliminieren waren und zugleich dieses Verfahren mit den

in der Literatur beschriebenen zu vergleichen (23,38,40). Für die in der Folge beschriebenen Versuche wurden HeLa-Zellen verwendet, die mit M.orale kontaminiert waren.

3.5.1. Bestimmung des Ausmasses der Kontamination mit Mykoplasmen in Zellkulturen

Voraussetzung für vergleichende Untersuchungen von Hemmwirkungen verschiedener Substanzen und Behandlungsmethoden auf das Mykoplasmenwachstum war ein geeignetes Verfahren, die Mykoplasmen in einer Zellkultur zu quantifizieren. Es wurden zuerst Vorversuche durchgeführt, die abklären sollten, wie verlässlich das kulturelle Verfahren für die Quantifizierung ist. Für diese Versuche wurde A.laidlawii verwendet, und zu diesem Zwecke eine 54 Stunden Kultur in 20 Portionen aufgeteilt und eingefroren. Dann wurde im Verlaufe von 4 Wochen der Gehalt an infektiösen Einheiten dieser Portionen untersucht. Im Mittel konnten wir $69,5 \times 10^6$ CFU/ml nachweisen, mit einer Standardabweichung von 35×10^6 CFU/ml. Die Extremwerte betrugen 100 Mio, resp. $17,5 \times 10^6$ CFU/ml. Die Vorversuche zeigten, dass beim kulturellen Nachweisverfahren mit grossen Schwankungen zu rechnen war.

Kulturell wurden die infektiösen Einheiten im Zellüberstand pro ml festgestellt. Im weiteren wiesen wir die Mykoplasmen in der ganzen Zellkultur nach (Zellen und Ueberstand). Zu diesem Zwecke wurden die Zellkulturen tiefgefroren und wieder aufgetaut, mit einer Gummifahne die noch haftenden Zellen von der Unterlage abgelöst und mit dem Ueberstand in eine Suspension gebracht. Von dieser Suspension wurden 20 µl auf Mykoplasma-Agar (Schälchen mit 30 mm Durchmesser) gegeben.

Biochemisch wurden mit dem Hoechstfarbstoff prozentual die Mykoplasmen aufweisenden Zellen erfasst. Die Mykoplasmen

erscheinen als feine Granula auf der Zelloberfläche. Die Dichte dieser Granula auf den Zellen ergibt einen Hinweis auf das Kontaminationsausmass.

Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, war die Bestimmung der CFU im Zellkulturüberstand grossen Schwankungen unterworfen.

Wenn sowohl Zellkulturüberstand wie Zellrasen vereinigt nach Einfrieren und Auftauen auf CFU/ml untersucht wurden, fielen die Streuungen etwas geringer aus. Aber sie korrelierten nicht mit den Werten, welche sich bei Anwendung eines biochemischen Nachweisverfahrens ergaben. Nach Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr. 33258 wurde die Zahl der mit Mykoplasmen befallenen Zellen in einer Kultur eruiert. Nach den in Tabelle 3 gezeigten Ergebnissen kam das kulturelle Nachweisverfahren nurmehr für einen qualitativen Nachweis in Frage. Die Auszählung von mykoplasmenkontaminierten Zellen nach Färbung mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 eignete sich jedoch für den quantitativen Nachweis.

3.5.2 Versuche zur Elimination von Kontaminationen mit Mykoplasmen in Zellkulturen mittels Kombination von Econazol und Antibiotika

Nach einer Passage der Zellen wurde das Nährmedium mit den entsprechenden Hemmstoffkonzentrationen versetzt und die Zellen 3 Tage inkubiert. Der Erfolg der Behandlung wurde kulturell und mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 überprüft. Ausserdem wurde täglich mikroskopisch kontrolliert, ob toxische Effekte an den Zellen festzustellen waren. Die für die HeLa-Zellen toxische Konzentration lag für Gentamicin allein bei 1100 µg/ml, für Erythromycin und Tylosin bei 300 µg/ml. Bei Kombination mit Econazol 2,5 µg/ml blieb sich die toxische Konzentration für Erythromycin und Tylosin gleich, einzig für Gentamicin lag sie um

100 µg/ml tiefer (1000 µg/ml statt 1100 µg/ml).

In Tabelle 4 sind Versuche, Mykoplasmen mit einer Kombination von Econazol und Antibiotika in Zellkulturen zu eliminieren, zusammengefasst.

Nur mit Gentamicin konnte eine Verbesserung des Effektes bei der Kombination mit Econazol 2,5 µg/ml beobachtet werden. Die Zahl der Zellen mit Mykoplasmen konnte bis auf 15% herabgesetzt werden. Nach spätestens 2 Zellpassagen jedoch waren keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle mehr feststellbar. Zu beachten ist, dass in jeder Behandlungsgruppe kulturell Mykoplasmen nachzuweisen waren.

Mit Gentamicin allein und Gentamicin kombiniert mit Econazol 2,5 µg/ml wurde zusätzlich versucht, eine mit Mykoplasmen kontaminierte BHK Zellkultur (Baby hamster kidney) zu behandeln. Die für diese Zelllinie toxische Konzentration von Gentamicin lag bei 300 µg/ml. Bei Kombination von Gentamicin 300 µg/ml mit Econazol 2,5 µg/ml konnte die Kontamination jedoch nur soweit herabgesetzt werden, dass 75% der Zellen noch Mykoplasmen aufwiesen, statt 100%, wie bei der unbehandelten Kontrolle (Nachweis mit Hoechstfarbstoff Nr. 33258). Kulturell waren stets Mykoplasmen nachweisbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Tylosin und Erythromycin nicht mehr in die weitere Evaluation einbezogen. Wir beschränkten uns in der Folge allein auf Gentamicin.

3.5.3. Dekontamination von HeLa-Zellen mittels Makrophagen allein und in Kombination mit Antibiotika

Es handelt sich um ein von Schimmelpfeng et al (38) beschriebenes Verfahren, das darauf beruht, dass bei kurzer Kokultivation von kontaminierten Zellen mit Mäusemakrophagen in Gegenwart von Antibiotika Mykoplasmen eliminiert werden.

Wir gingen im Prinzip wie folgt vor:

Aus Mäusen isolierte Peritoneal-Makrophagen wurden auf eine 24 Lochplatte ausgesät. Nach einem Tag Inkubation wurden die kontaminierten Zellen in unterschiedlicher Konzentration zugegeben. Teils mit, teils ohne Antibiotika wurde die Zellpopulation miteinander inkubiert, anschliessend die HeLa-Zellen mit Trypsin gelöst und weiter kultiviert. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Bei keiner der behandelten HeLa-Zellkulturen konnte die Kontamination mit Mykoplasmen ganz eliminiert werden. Nur in Kombination mit Antibiotika liess sich die Verunreinigung partiell unterdrücken, und dies auch nur bei hoher Makrophagen- und niedriger HeLa-Zellzahl. Kulturell waren Mykoplasmen in jeder Behandlungsgruppe nachweisbar.

3.5.4. Elimination von Mykoplasmen aus Zellkulturen mittels 5-Bromourazil und Hoechstfarbstoff Nr. 33258

Die Methode besteht in einer selektiven Abtötung von Mykoplasmen basierend auf dem verschiedenen Nukleinsäuremetabolismus von Mykoplasmen und tierischen Zellen. 5-Bromourazil wird als freies Basenanalogon in die Nukleinsäure von Mykoplasmen eingebaut. Sichtbares Licht verursacht Brüche in einer DNA, die 5-Bromourazil enthält. Die Photoempfindlichkeit wird durch die Bindung an ein Fluorochrom (Hoechst-

farbstoff Nr. 33258) noch erhöht (23).

Wir verfahren bei diesen Versuchen wie folgt:

Unter Einwirkung von 5-Bromourazil und Hoechstfarbstoff Nr. 33258 wurden die Zellen 30 Minuten dem Licht ausgesetzt. Diese Behandlung wiederholten wir alle 24 Stunden. Nach 5,6 resp. 7 Tagen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Medium verdünnt und in die 24 Lochplatten ausgesät (pro Delle etwa 100 Zellen). Der Erfolg der Behandlung wurde mit der kulturellen Nachweismethode und biochemisch mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 kontrolliert. Am 7. Tag musste die Behandlung abgebrochen werden, da sich ein Teil der Zellen abzulösen begann. Es fiel auch auf, dass die Zellen nach der Behandlung stärker metabolisierten (Ansäuerung des Nährmediums). In Tabelle 6 sind die Resultate dieser Versuche wiedergegeben. Es ist daraus ersichtlich, dass zwar die Mykoplasmenbelastung mit zunehmender Behandlungsdauer kleiner geworden ist, doch liess sich die Kontamination nicht total unterdrücken.

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen:

Mit den drei Behandlungsmethoden (Antibiotika, Makrophagen + Antibiotika, 5-Bromourazil und Hoechstfarbstoff) liessen sich Mykoplasmenkontaminationen aus Zellkulturen nicht total eliminieren. Wir hatten es bei diesen Versuchen sowohl mit an Zellen haftenden wie auch im Zellkulturmedium frei suspendierten Mykoplasmen zu tun.

3.6. Versuche, die Mykoplasmen von der Zelloberfläche zu lösen und dann mit Hemmstoffen zu eliminieren

Nach Färbung mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 und bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass Mykoplasmen mit der Zellmembran innig verbunden sind (24,34,46). Die Frage, ob Mykoplasmen überhaupt intrazellulär vorkommen, ist noch umstritten (24,46). Unsere bisherigen Versuche lassen den Schluss zu, dass frei suspendierte Mykoplasmen gegenüber Antibiotika empfindlicher sind als an Zelloberflächen haftende. Es ist dies insofern eine Bestätigung der Befunde von Nègre (25), der die Kontamination im Ueberstand, aber nicht im Zellrasen unterdrücken konnte. Es wurde deshalb versucht, Mykoplasmen zuerst enzymatisch von den kultivierten Zellen zu lösen und sie als losgelöste Keime der Wirkung des Hemmstoffes direkt auszusetzen.

3.6.1. Elimination von Mykoplasmen aus einer HeLa-Zellkultur mittels Berol

Das oben beschriebene Prinzip der Loslösung der Mykoplasmen von den Zellen und der anschliessenden Lysierung mittels Detergentien wurde von verschiedenen Autoren

(19,25,40) beschrieben. So wurde unter anderem Berol 043 (Berol Kemi AG, Stenungsund, Sweden) verwendet, um Mykoplasmenkontaminationen aus Zellkulturen zu eliminieren (40).

Bei der Nachprüfung des Berol-Verfahrens gingen wir im Prinzip wie folgt vor:

Zellen wurden mit Trypsin von der Unterlage, auf der sie wuchsen, losgelöst, in Berol aufgenommen, mit kaltem, foetalem Kälberserum unterschichtet und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und inkubiert.

Für die Behandlung von HeLa-Zellen musste die Konzentration wegen Toxizität von Berol auf 0,0005% herabgesetzt werden. Schreier et al setzten Berol in einer Konzentration von 0,01% ein (40). Die Zeit von der Zugabe des Detergens bis zum Beginn der Zentrifugation hielten wir konstant bei 2,5 Minuten, reduzierten aber die Konzentration soweit, bis die Zellen keinen mikroskopisch feststellbaren Schaden mehr nahmen.

Aus Tabelle 7 erhellt, dass eine Elimination der Mykoplasmen nur mit toxischen Konzentrationen von Berol möglich war. Auffällig war die 50 x höhere Toxizität der von uns verwendeten Berol-Charge.

3.6.2. Versuche zur Elimination von Mykoplasmen aus HeLa-Zellkulturen durch Loslösung von der Zelle mit Neuraminidase und anschliessender Antibiotikabehandlung

Mykoplasmen benützen zur Haftung an der Zelloberfläche neuraminidaseempfindliche Rezeptoren (11,21,22). Wir versuchten, die Mykoplasmen zuerst mit Hilfe von Neuraminidase von den Zellen zu lösen, um sie dann im Ueberstand mit Hemmstoffen in Kontakt zu bringen. Es kamen zwei Verfahren zur Anwendung: 1. Neuraminidasebehandlung

allein, 2. Neuraminidasebehandlung, kombiniert mit einer anschliessenden Antibiotikabehandlung.

1. Behandlung einer HeLa-Zellkultur mit Neuraminidase allein

Abb. 3 zeigt den Verlauf einer Mykoplasmenkontamination nach einer Neuraminidasebehandlung. Es wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit Mykoplasmen nach Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr. 33258 bestimmt. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die kontaminierten Zellen nicht gleichmässig über den ganzen Zellrasen verteilt waren, wie das sonst der Fall war, sondern herdförmig angeordnet. Die einzelnen Mykoplasmen erschienen auf der Zelloberfläche nicht mehr als gut voneinander abgrenzbare Granula sondern als etwas diffuse "Wolke". Diese Befunde zeigten, dass der Einfluss von Neuraminidase auf die Haftung von Mykoplasmen an Zellen auch morphologisch nachzuweisen war. Die Kontamination war auch kulturell nachweisbar.

Mit einer einzigen Neuraminidasebehandlung war der Prozentsatz Mykoplasmen-tragender Zellen von 95% auf 50% zu senken. Bei den nächsten Zellpassagen stieg jedoch die Zahl der kontaminierten Zellen wieder auf den Kontrollwert einer nichtbehandelten Kultur an. Die Neuraminidasebehandlung hatte keinen gravierenden toxischen Einfluss auf die kultivierten Zellen.

2. Behandlung einer HeLa-Zellkultur mit Neuraminidase (einmal) und Antibiotika

Vorerst wurde eine Behandlung mit Neuraminidase wie oben durchgeführt. Anschliessend wurde dem Medium Gentamicin 300 µg/ml resp. 450 µg/ml in Kombination mit Econazol 2,0 µg/ml zugegeben. In Abb. 4 sind die Resultate der Versuche mit 450 µg/ml Gentamicin wiedergegeben. Grosso modo verlief die Kontamination bei Zugabe von 300 µg/ml

Gentamicin gleich. Es war auffallend, dass zum ersten Male nach einer Behandlung während 2 Passagen weder kulturell im Ueberstand noch biochemisch mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 auf den Zellen Mykoplasmen nachzuweisen waren. Nach der zweiten Passage stieg der Prozentsatz der Zellen mit Mykoplasmen wieder an und erreichte einen höheren Prozentsatz wenn nur bei der ersten Passage mit Antibiotika behandelt, als wenn bei jeder Passage von neuem Gentamicin zugefügt wurde. Der Unterschied zwischen mehrmaliger und einmaliger Behandlung blieb aber gering (5-10%).

3. Behandlung einer HeLa-Zellkultur mit Neuraminidase (zweimal) und Antibiotika

Die vorhergehenden Versuche hatten gezeigt, dass mit einer einmaligen Neuraminidase- kombiniert mit einer Antibiotikabehandlung die Kontamination mit Mykoplasmen wenigstens temporär (zwischen zwei Zellpassagen) gänzlich unterdrückt werden konnte. Es sollte nun versucht werden, mit einer zweimaligen Neuraminidasebehandlung (bei der 1. + 3. Passage) Mykoplasmen während einer längeren Zeitspanne zu unterdrücken oder sogar ganz zu eliminieren.

Gentamicin wurde in einer Versuchsgruppe bei der 1. und 3. Passage dem Medium beigelegt, in der anderen Versuchsgruppe bei jeder Passage. Die Resultate dieser Versuche sind in Fig. 5 graphisch dargestellt. Wiederum sind nur die Ergebnisse der Behandlung mit 450 µg/ml Gentamicin berücksichtigt. Bei einer Konzentration von 300 µg/ml Gentamicin verlief die Kontaminationskurve parallel, aber es fanden sich 10% mehr Zellen mit Mykoplasmen.

Eine Passage nach der Behandlung mit Neuraminidase konnten weder kulturell noch mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 Mykoplasmen in der Kultur nachgewiesen werden (Passage 2 und Passage 4). Doch stieg auch nach zweimaliger Behandlung

mit Neuraminidase der Prozentsatz der Zellen mit Mykoplasmen wieder an und erreichte nach Passage 8 praktisch wieder den Kontrollwert unbehandelter Zellkulturen. Immerhin konnte während 5 Passagen (15 Tage) der Prozentsatz von Zellen mit Mykoplasmen unter 30% gehalten werden. Wahrscheinlich hätte die Behandlung noch effizienter gestaltet werden können, wenn die 2. Neuraminidaseapplikation bei der 2. Passage statt erst bei der 3. Passage erfolgt wäre. Schon eine Passage nach der 1. Neuraminidasebehandlung stieg der Kontaminationsgrad der Zellen wieder an, konnte dann aber mit der zweiten Neuraminidaseapplikation wieder auf 0% gedrückt werden. Trotzdem nach der Enzymbehandlung keine Mykoplasmen in der Zellkultur nachweisbar waren, muss angenommen werden, dass eine nicht feststellbare Restkontamination zurückblieb, die innert 3-8 Tagen (1-2 Zellpassagen) wieder zu einer "Vollkontamination" auswachsen konnte.

4. DISKUSSION

Kontaminationen mit Mykoplasmen stellen ein grosses Problem für Zellkulturen dar, nicht nur weil sie zum Verlust von Kulturen führen können, sondern weil auch die Ergebnisse einer Vielzahl von Versuchen, die man mit Zellen durchführt, beeinflusst werden können.

Zuerst einige Bemerkungen zum Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen. Eine Mykoplasmenkontamination in einer Zellkultur kann so diskret verlaufen, dass sie weder makroskopisch noch lichtmikroskopisch festgestellt wird. Erst eine relativ starke Mykoplasmenkontamination bewirkt eine vermehrte Lichtbrechung an den Zellgrenzen. Wenn solche Phänomene auftreten, muss stets an eine Kontamination mit Mykoplasmen gedacht werden.

Für den spezifischen Mykoplasmennachweis in Zellkulturen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (13):

Kulturell können die Mykoplasmen in flüssigem und auf festem Nährmedium nachgewiesen werden. Ein nicht-kultureller Nachweis erfolgt mittels Histologie nach Giemsa oder Acridinorange-Färbung, Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenz, Enzymnachweis (Arginin-Deaminase Aktivität), Genomgrössenbestimmung, DNA-Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr. 33258, Untersuchung des Verhältnisses Uridin:Urazil, Autoradiographie nach $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau.

Für unsere Untersuchungen bedienten wir uns der folgenden zwei einfachen und doch effizienten Nachweisverfahren:

Mykoplasmen wurden kulturell auf einem festen PPLO Nährboden nachgewiesen (Koloniebildung). Versuche, Mykoplasmen aus Zellkulturüberständen direkt in PPLO-Bouillon zur Vermehrung zu bringen, misslangen. Erst als die PPLO-Bouillon mit 10% foetalem Kälberserum angereichert wurde, gelang die Kultivierung in 2 von 5 Versuchen. Wurden die

Mykoplasmen aus dem Zellüberstand hingegen zuerst auf festem Mykoplasma-Agar gezüchtet, so war das anschliessende Wachstum in PPLO-Bouillon nicht mehr gehemmt. Die in unsere Versuche einbezogenen Mykoplasmen wuchsen bei anaerober Bebrütung besser als bei aerober. Beim Nachweis von Kontaminationen in Zellkulturen sollte unbedingt sowohl anaerob wie auch aerob bebrütet werden.

Der biochemische Mykoplasmenachweis mittels Hoechstfarbstoff Nr. 33258 ist eine schnelle, einfache und sensible Methode (3). Es wird die extrazelluläre Fluoreszenz in Deckglaskulturen nachgewiesen. Je nach Anzahl der Zellen, die ausgesät wurden, konnte das Resultat nach 8-24 Stunden abgelesen werden. Falsch positive Ergebnisse können sich ergeben, wenn sich unter dem Deckglas Luftblasen befinden, oder wenn die Zellen sofort nach der Färbung mikroskopisch beurteilt werden. Zellen unmittelbar vor oder nach der Mitose weisen vielfach Farbrückstände im Zytoplasma oder auf der Zellmembran auf. Aus diesem Grunde wurden mitotische Zellen bei der mikroskopischen Beurteilung nicht berücksichtigt.

Falsch negative Resultate ergaben sich regelmässig, wenn in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C zur Konservierung eingefrorene Zellen aufgetaut wurden. In den ersten zwei Passagen nach dem Auftauen fanden sich mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 keine Mykoplasmen. So beurteilte man in zwei Fällen Zellen nach der Färbung als frei von Mykoplasmen, doch konnten kulturell 20 resp. 40 CFU/ml isoliert werden. In der nächsten Passage liessen sich die Mykoplasmen auch biochemisch nachweisen. Diese Befunde zeigen die Nachweisgrenze der Hoechstfarbstoff-Methode auf. Die niedrige Kontaminationsrate konservierter Zellen könnte auf die Präsenz von DMSO zurückzuführen sein (18) (Bakteriostase, vielleicht auch Hemmung von Mykoplasmen

sowie Membranveränderungen). Auch das Einfrier- und Auftauprozedere könnte die Trennung von Zellen und Mykoplasmen bewirkt haben.

In einem nächsten Schritt galt es, ein Verfahren für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in vitro der in Aussicht genommenen Hemmstoffe und eine einfache Quantifizierungsmethode auszuarbeiten. Die in der Literatur angegebenen Verfahren zur Quantifizierung von Mykoplasmen (15,16,30,31,41) waren für unsere Zwecke nicht zu gebrauchen. Es wurde schliesslich eine Proteinbestimmungsmethode ausgearbeitet, die auf einfache und exakte Weise erlaubte, das Wachstum von Mykoplasmen zu quantifizieren. Die Nachweisgrenze lag bei 1 Mio CFU/ml. Der Background von ca. 0.050 OD₅₉₅ ist durch nicht vollständig ausgewaschenes, aus dem Zellkulturmedium stammenden Protein bedingt. Mit diesem Verfahren prüften wir an *M. hyorhinis* und *A. laidlawii* die MIC von Econazol, Gentamicin, Erythromycin und Tylosin, an *A. laidlawii* zusätzlich diejenige von Imazalilsulfat, Ketokonazol und 2.4-Dimethylphenol. Die Wachstumskurven zeigen, dass sich das Verfahren bewährte. Die Proteinbestimmungsmethode eignet sich auch zur serienmässigen Prüfung von Substanzen auf mykoplasma-statische Wirkung.

In vitro war es leicht, mit Gentamicin, Erythromycin und Tylosin das Mykoplasmenwachstum zu hemmen und dies in Konzentrationen, die weit (Gentamicin 100 x) unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze lagen. Bei Imazalilsulfat, Ketokonazol und 2,4-Dimethylphenol war der therapeutische Index so klein, dass wir auf die Weiterführung von Versuchen mit diesen Hemmstoffen verzichteten.

Mit dem Proteinbestimmungsverfahren konnte auch eine synergistische Wirkung von Econazol bei einer Kombination mit Antibiotika gezeigt werden. Ein Synergismus ist bei einer

Econazolkonzentration von 6,5 µg/ml nachgewiesen worden. Die für die Hemmung des Mykoplasmenwachstums notwendige hohe Econazolkonzentration lässt sich durch die hohe Cholesterolkonzentration im Pferdeserum (0.82 mg/ml) erklären. Aus der Literatur ist bekannt (45), dass die MIC₅₀ mit der Cholesterolkonzentration im Medium steigt.

Unser eigentliches Ziel war die Elimination von Mykoplasmen aus Zellkulturen. In der Literatur sind zahlreiche Methoden beschrieben, wie eine solche Kontamination zu eliminieren wäre (1,4,23,29,38,40,45). Unsere Versuche der Verunreinigung mittels 5-Bromourazil (23), Makrophagen und Antibiotika (38) oder Berol (40) Herr zu werden, misslingen. Mit keinem der drei Verfahren konnten HeLa-Zellkulturen von den Mykoplasmen gänzlich befreit werden. Ebenso wenig gelang es uns, mit Antibiotika und Hemmstoffkombinationen Mykoplasmenkontaminationen total zu eliminieren, obschon in Versuchen bis zu 90 mal höhere Konzentrationen als die MIC eingesetzt wurden. Die Misserfolge der Behandlung könnten mit dem sehr engen Kontakt, den die Mykoplasmen mit der Zellmembran eingehen (24,34,46), zusammenhängen. Zucker-Franklin et al (46) vermuten, dass dadurch zelluläre Nährstoffe in die Mykoplasmen diffundieren. Wenn auch der Uebertritt von Proteinen möglich wäre, würde dies die Resistenz der Mykoplasmen in Zellkulturen gegenüber Hemmstoffen, die den Proteinstoffwechsel (Gentamicin, Erythromycin) beeinflussen, erklären. Es wäre auch denkbar, dass beim Kontakt Zelle-Mykoplasma, die Membranpermeabilität des Kontaminanten verändert würde und Hemmstoffe nicht mehr in die Mykoplasmen zu penetrieren vermögen.

Basierend auf der hochgradigen Empfindlichkeit von Mykoplasmen in Suspensionen (ohne Zellkontakt) gegenüber Hemmstoffen und dem postulierten Wirkungsmechanismus von Berol

(Ablösung und Lyse der freien Mykoplasmen) arbeiteten wir die Behandlungsmethode mit der enzymatischen Loslösung der Mykoplasmen von Zellen in Gegenwart von Antibiotika aus. Die Verbindung Zelle-Mykoplasma kann durch Trypsin aufgehoben werden (19). Diese Protease führt aber rasch zur Schädigung der Zellen, die sich von der Unterlage ablösen. Garbridge und Manchee beschrieben, dass zellständige Rezeptoren für Mykoplasmen mit Neuraminidase abgebaut werden können (11,12,21). Um die enge Verbindung Mykoplasmen-Zellen aufzulösen, wurde deshalb Neuraminidase verwendet. Dieses Enzym führte zu einer minimalen Schädigung der Zellen. Wie die Versuche zeigten, war es nur mit Neuraminidase und Antibiotika möglich, wenn auch temporär, mykoplasmenfreie Zellkulturen zu erhalten, und zwar über 1 - 2 Passagen. Die Kontamination konnte zusätzlich über 5 Zellpassagen auf einem niedrigen Niveau gehalten werden. In dieser Zeitspanne wäre es durchaus möglich gewesen, Versuche mit Zellen, welche eine geringe Kontaminationsrate aufweisen, durchzuführen, was gegenüber einer sonst 90%igen Kontamination einen echten Fortschritt bedeutet.

Der weiter einzuschlagende Weg scheint damit vorgezeichnet: Die Mykoplasmen sind von den Zellen frei zu bekommen, und frei suspendiert mit Hemmstoffen in Kontakt zu bringen. Es sind gegenwärtig Versuche im Gange, die Neuraminidasebehandlungen in engeren Intervallen mehrmals hintereinander durchzuführen, um idealerweise möglichst alle Mykoplasmen von den Zellen zu lösen und sie ohne engen Zellkontakt der Hemmstoffwirkung auszusetzen. Es besteht auch Grund zur Hoffnung, mit der Klonierung von Einzelzellen nach der Neuraminidase-Antibiotika-Behandlung eine von Mykoplasmen freie Zellkultur aufzubauen. Es sind nach dieser Behandlung weder kulturell noch biochemisch Mykoplasmen nachweisbar. Die Wahrscheinlichkeit ist deshalb gross, dass in der

Zellpopulation Zellen in grösserer Zahl vorhanden sind, an denen keine Mykoplasmen haften.

Mit Barile (43) gehen wir einig, dass die bisher gebräuchlichen Behandlungsmethoden keine Therapia magna sterilisans ermöglichen. Potentiell besteht die Gefahr, dass ein versteckter, nicht erfassbarer Keim an einer Zelle haftet, und nach Vermehrung wieder zu einer Vollkontamination führen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, anhand des Proteinzuwachses in einer PPLO-Bouillon-Kultur das Wachstum von Mykoplasmen zu erfassen. Mit dieser Methode wurden Wachstumskurven von *A.laidlawii* und *M.hyorhinis* erstellt, und die minimale Hemmkonzentration von Erythromycin, Tylosin, Gentamicin und Econazol gegenüber *A.laidlawii* und *M.hyorhinis* bestimmt.

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen wies man kulturell auf Mykoplasmen-Agar und biochemisch mit dem Hoechstfarbstoff Nr. 33258 nach.

Die Versuche zeigten, dass frei suspendierte Mykoplasmen gegenüber Antibiotika viel empfindlicher waren als an Zellen haftende Mykoplasmen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Verfahren zur Elimination von kontaminierenden Mykoplasmen aus Zellkulturen entwickelt. Das Verfahren bestand darin, mit Neuraminidase die Verbindung Mykoplasma-Zelle zu lösen und anschliessend die frei suspendierten Mykoplasmen der Wirkung von Hemmstoffen auszusetzen. Mit dieser Behandlungsmethode konnte die Kontamination wenigstens temporär zum Verschwinden gebracht werden, während dies mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren (Makrophagen, 5-Bromourazil und Berol) nicht gelang. Die Elimination mit Berol scheiterte an der Zelltoxizität der Substanz.

Die grosse Zahl von Zellen, die nach der Neuraminidase-Antibiotikabehandlung frei von Mykoplasmen waren, eröffnet die Möglichkeit, neue dekontaminierte Zellklone zu gewinnen.

Tabelle 1

MIC von Econazol, Gentamicin, Erythromycin, Tylosin und Imazalilsulfat gegenüber A.laidlawii und M.hyorhinis sowie Zelltoxizität der Hemmstoffe

Hemmstoff	minimale Hemmstoffkonzentrationen µg/ml				Zytotoxizitäts- grenze (HeLa-Zellen)
	A.laidlawii		M.hyorhinis		
	Protein- bestimmung	Unterdrückung des Wachstums ¹	Protein- bestimmung	Unterdrückung des Wachstums	
Econazol	15	15	25	30	3
Gentamicin	10	10	10	10	1'100
Erythromycin	5	5	5	10	300
Tylosin	0,08	0,25	n.d.	n.d.	300
Imazalilsulfat	15	20	n.d.	n.d.	5

n.d. = nicht durchgeführt

1 kultureller Nachweis

Hemmwirkung von Econazol in Kombination mit einem Antibiotikum auf das Mykoplasmenwachstum

Die Vermehrung der Mykoplasmen wurde in drei Versuchen anhand der Erhöhung der Proteinkonzentration gemessen.

Hemmstoffzugabe		Mykoplasmenwachstum resp. - hemmung					
Econazol µg/ml	Antibiotikum µg/ml	1. Versuch		2. Versuch		3. Versuch	
		CFU/ml $\times 10^6$	Wachstums- hemmung %	CFU/ml $\times 10^6$	Wachstums- hemmung %	CFU/ml $\times 10^6$	Wachstums- hemmung %
-	-	105	0	127	0	98	0
6.5	-	56	46	66	58	41	58
-	1.0 Gentamicin	61	42	64	50	71	28
6.5	1.0 Gentamicin	<u>15</u>	<u>85</u>	<u>11</u>	<u>91</u>	<u>5</u>	<u>94</u>
-	-	107	0	105	0	100	0
6.5	-	43	59	41	60	38	62
-	0.055 Erythromycin	99	7	105	0	100	-
6.5	0.055 Erythromycin	<u>6</u>	<u>95</u>	<u>11</u>	<u>90</u>	<u>10</u>	<u>90</u>
-	-	98	0	112	0	105	0
6.5	-	41	58	53	53	56	56
-	0.03 Tylosin	74	24	100	11	82	12
6.5	0.03 Tylosin	5	<u>95</u>	<u>15</u>	<u>87</u>	<u>22</u>	<u>79</u>

Tabelle 3

Quantifizierung des Ausmasses einer Kontamination mit Mykoplasmen in Zellkulturen. Vergleich der biochemischen- (Hoechstfarbstoff Nr.33258) mit der kulturellen Nachweismethode

Zellkultur	biochem.Nachweis ¹ % Mykoplasmen befallener Zellen	kultureller Nachweis infektiöse Einheiten	
		im Ueberstand CFU/ml	auf Zellen + im Ueberstand CFU/ml
A	0	0	
B	2,5	5'300	
C	3,0	4'500	
D	4,5	100	
E	7,0	7'750	
F	88,9	13'500	
G	1,5		22'000
H	5,5		150'000
I	10		125'000
K	49,5		387'000
L	54,5		777'000

1 mit Hoechstfarbstoff Nr.33258

Tabelle 4

Elimination von Kontaminationen mit Mykoplasmen in HeLa-Zell-
kulturen mittels einer Kombination Econazol und Antibiotika

Hemmstoffkonzentrationen		Mykoplasmennachweis	
µg/ml Econazol	µg/ml Antibiotika	biochem. ¹	kulturell ²
-	900 Gentamicin	31%	+
2.5	300 Gentamicin	49%	+
2.5	600 Gentamicin	52%	+
2.5	900 Gentamicin	<u>15%</u>	+
-	200 Erythromycin	65%	+
2.5	100 Erythromycin	86%	+
2.5	200 Erythromycin	61%	+
2.5	300 Erythromycin	56%	+
-	200 Tylosin	75%	+
2.5	100 Tylosin	91%	+
2.5	200 Tylosin	86%	+
2.5	300 Tylosin	51%	+
2.5	400 Tylosin	56%	+
Econazol	-	91%	+

1 Nachweisverfahren mit Hoechstfarbstoff Nr.33258.

% Zellen, die mit Mykoplasmen befallen waren

2 (kulturell) + = Mykoplasmen im Zellkulturüberstand kulturell nachgewiesen.

Tabelle 5

Behandlung einer mykoplasmenkontaminierten HeLa-Zellkultur mit Makrophagen allein und kombiniert mit Antibiotika

Makrophagen x 10 ⁵	HeLa-Zellen x 10 ⁵			Econazol/Gentamicin (µg/ml)	Mykoplasmennachweis mit Hoechstfarbstoff Nr.33258 ¹		kultureller Nachweis
3.5	0.5	1.0	1.5	2	+++ ²	+++	++++ ⁵
3.5	2.0	2.5	3.0	3.5	+++	+++	++++
4.0	2.0	2.5	3.0	3.5	+++	+++	++++
3.5	0.5	1.0	1.5	2.0	+++ ⁴	+++	++++
3.5	2.0	2.5	3.0	3.5	+++	+++ ³	++++
4.0	2.0	2.5	3.0	3.5	++	+++	++++
4.0	0.5	1.0	1.5	2.0	+	++	++++

1 Mykoplasmennachweis mit Hoechstfarbstoff Nr.33258

2 +++ Kontaminationsgrad wie in unbehandelten Kontrollen (>90% der Zellen mit Mykoplasmen behaftet)

3 ++ 50 - 70% der Zellen mit Mykoplasmen behaftet

4 + Weniger als 50% der Zellen mit Mykoplasmen behaftet

5 Kultureller Nachweis

Tabelle 6

Versuche zur Elimination der Mykoplasmenkontamination in einer HeLa-Zellkultur mittels 5-Bromourazil und Hoechstfarbstoff Nr. 33258

Behandlungstage	Mykoplasmennachweis	
	biochemisch ¹	kulturell ² CFU/ml
0 (Kontrolle)	+++ ¹	150'000 ²
5	+++	25'500
6	++	22'775
7	+	3'225

1 biochemisch: Nachweis mit Hoechstfarbstoff Nr. 33258:

+++ mehr als 70% der Zellen kontaminiert

++ 50 - 70% der Zellen kontaminiert

+ weniger als 50% der Zellen kontaminiert

2 Kultureller Nachweis von Mykoplasmen im Zellkulturüberstand (CFU/ml)

Tabelle 7

Elimination von Mykoplasmen in HeLa-Zellkulturen mittels
Berol

Berolkonzentration	Zelltod	Mykoplasmenachweis (kulturell)
0,01 %	+	-
0,005 %	+	-
0,001 %	+	-
0,0005 %	-	+

Abb. 1 Korrelation zwischen der Protein- und der
Mykoplasmenkonzentration

Auf der Ordinate ist die optische Dichte gemessen bei 595 nm eingetragen. Die Werte auf der Abszisse entsprechen der Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ resp. der Mykoplasmenkonzentration in 10^6 CFU/ml .

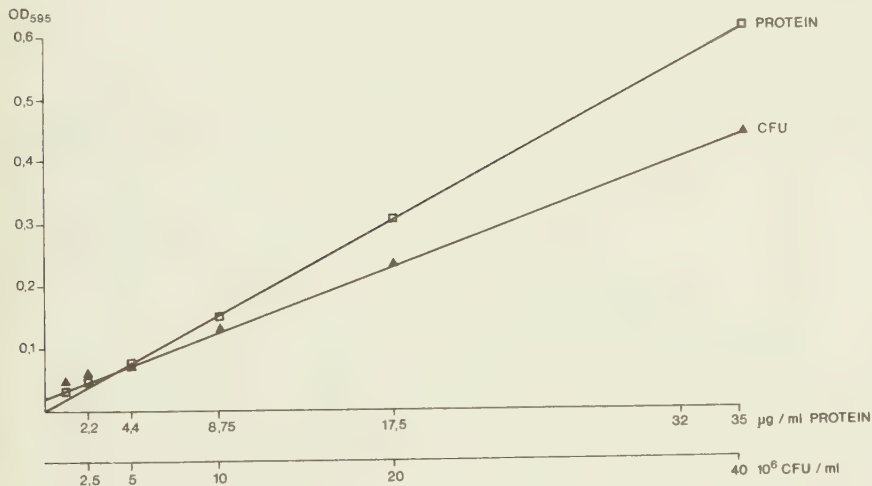


Abb. 2 Wachstumskurven von *A.laidlawii* und *M.hyorhina*
(Proteinbestimmungsverfahren)

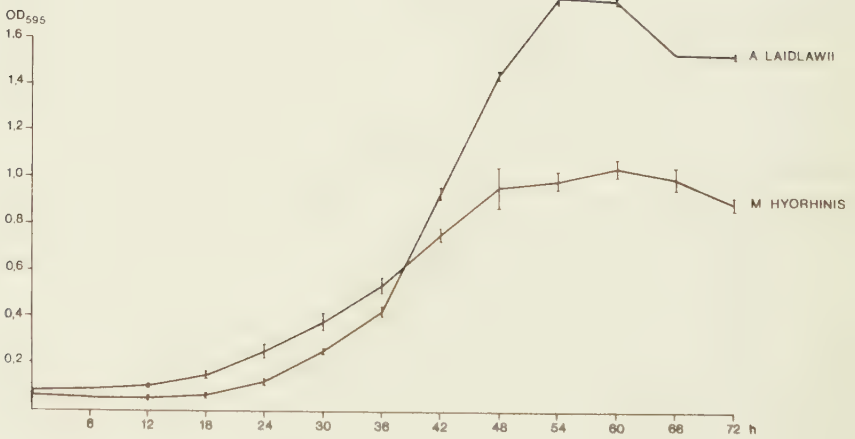


Abb. 3 Elimination von Mykoplasmen aus einer HeLa-Zell-
kultur mit einer einmaligen Neuraminidasebehandlung

Bei Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Neuraminidase (NA) behandelt. Im Verlaufe der folgende 3 Passagen wurde nach Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr.33258 der Prozentsatz der Zellen mit Mykoplasmen ermittelt.

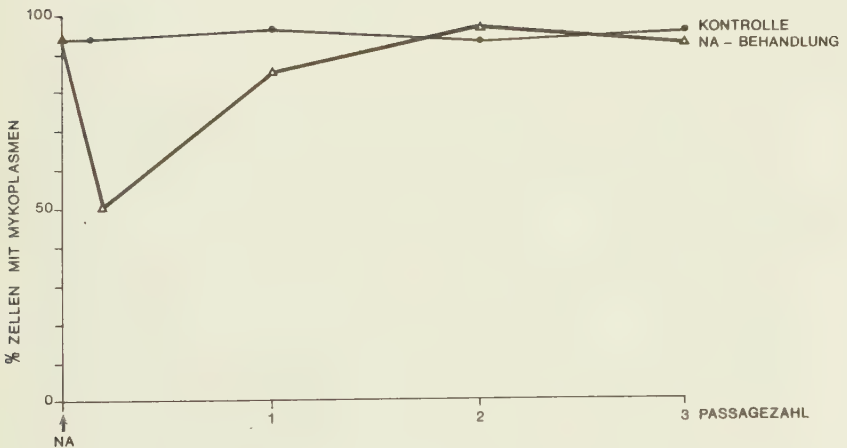


Abb. 4 Elimination einer Mykoplasmenkontamination mit einmaliger Neuraminidasebehandlung (NA) und anschliessender Antibiotikatherapie

Nach Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr.33258 wurde der Prozentsatz der Zellen mit Mykoplasmen ermittelt. Die Zahl der Passagen bezieht sich auf die Neuraminidasebehandlung (NA).

Mehrmalige Behandlung mit Antibiotika (GM jede Passage):
Das Medium wurde bei jeder Passage mit Gentamicin 450 $\mu\text{g/ml}$ und Econazol 2,0 $\mu\text{g/ml}$ ergänzt.

Einmalige Behandlung mit Antibiotika (GM 1x):

Nach einer initialen Behandlung mit Gentamicin 450 $\mu\text{g/ml}$ und Econazol 2,0 $\mu\text{g/ml}$ wurde auf eine weitere Zugabe von Hemmstoffen verzichtet.

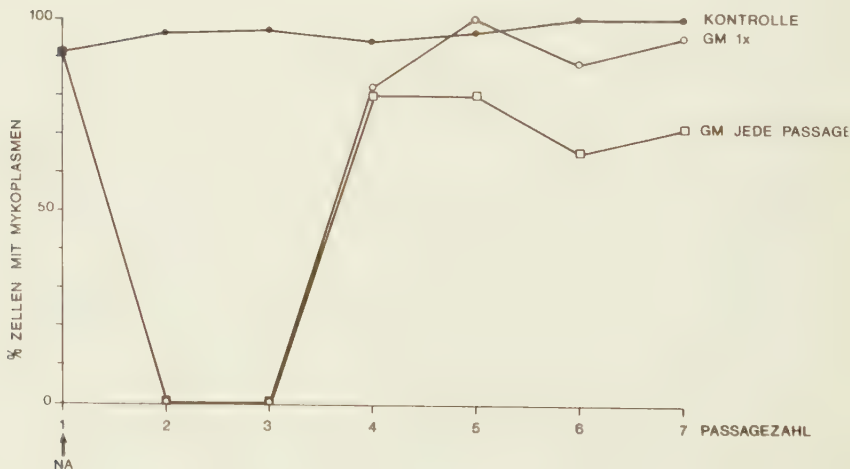


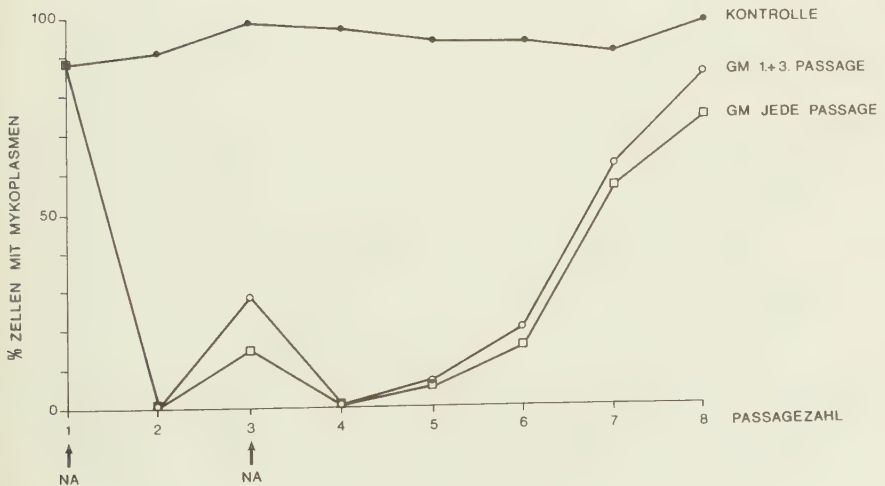
Abb. 5 Elimination einer Mykoplasmenkontamination mit zweimaliger Neuraminidasebehandlung (NA) und anschliessender Antibiotikatherapie

Nach Färbung mit Hoechstfarbstoff Nr.33258 wurde der Prozentsatz der Zellen mit Mykoplasmen ermittelt. Die Zahl der Passagen bezieht sich auf die erste Neuraminidasebehandlung (NA).

Antibiotikazugabe bei jeder Passage (GM jede Passage):

Das Medium wurde bei jeder Passage mit Gentamicin 450 µg/ml und Econazol 2,0 µg/ml ergänzt.

Antibiotikazugabe ausschliesslich nach Neuraminidasebehandlung (GM 1. + 3. Passage): Antibiotikakonzentration wie oben.



6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agee, C.C., J.A. Engelhardt, and M.G. Gabridge. Antimycoplasmal activity of dimethylphenols in a tracheal explant culture system. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 243-248, 1980.
2. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.
3. Chen, T.R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp. Cell Res. 104, 255-262, 1977.
4. Christianson, G.G., J.R. Pemberton, and T.A. Koski. Inactivation of mycoplasma in serum with binary ethyleneimine. J.Clin. Microbiol. 11, 377-379, 1980.
5. Dent, P.B., G.B. Cleland, and S.-K. Liao. Detection and control of occult mycoplasma contamination in human tumor cell lines. Cancer Immunol. Immunother. 8, 27-32, 1980.
6. Ellner, P.D., P.A. Granato, and C.B. May. Recovery and identification of anaerobes: A system suitable for the routine clinical laboratory. Appl. Microbiol. 26, 904-913, 1973.
7. Erb, P., and W. Bredt. Interaction of mycoplasma pneumoniae with alveolar macrophages: Viability of adherent and ingested mycoplasmas. Infect. Immunity 25, 11-15, 1979.

8. Fletcher, R.D., J.R. Gilbertson, A.C. Albers, and J.D. White. Inactivation of mycoplasmas by long-chain alcohols.
Antimicrob. Agents Chemother. 19, 917-921, 1981.
9. Fogh, J. Contamination in tissue culture.
Academic Press New York and London, 1973.
10. Fogh, J., and H. Fogh. Chromosome changes in PPLO-infected FL human amnion cells.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 119, 233-238, 1965.
11. Gabridge, M.G., and D. Taylor-Robinson. Interaction of Mycoplasma pneumoniae with human lung fibroblasts: Role of receptor sites.
Infec. Immunity 25, 455-459, 1979.
12. Gabridge, M.G., D. Taylor-Robinson, H.A. Davies, and R.R. Dourmashkin. Interaction of Mycoplasma pneumoniae with human lung fibroblasts: Characterization of the in vitro model.
Infec. Immunity 25, 446-454, 1979.
13. McGarrity, G.J., D.G. Murphy, and W.W. Nichols. Mycoplasma infection of cell cultures.
Plenum Press, New York and London, Vol. 3, 1977.
14. Goldstein, N.I., A.H. McIntosh, P.B. Fisher, K.Maramorosch, and C.P. Schaffner. In vitro anti-mycoplasmal activity of amphotericin B methyl ester.
J. Antibiot. 14, 656-659, 1976.
15. Hayflick, L. The mycoplasmatales and the L-phase of Bacteria.
North-Holland Publishing Company Amsterdam, 1969.

16. Heller, H.A., R. Spector, and M. Aalyson. Effect of sodium chloride on gentamycin accumulation by *Escherichia coli*: correltaion with bacterial growth and viability. *J. Antibiot.* 18, 604-613, 1980.
17. Herring, P.K., and J. D. Pollack. Utilization of (1-¹⁴C) Acetate in the synthesis of lipids by *Acholeplasmas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24, 73-78, 1974.
18. Jacob, S.W., and K. Herschler, Biological actions of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Academy Sci.* 243, 8 - 11, 1975.
19. Kojo, K., K. Yamada, T. Sasaki, M. Shintani, and H. Okumura. Attachment of *Mycoplasma hominis* and *M. orale* to human diploid lung fibroblasts. *Microbiol. Immunol.* 25, 745-749, 1981.
20. Lampen, J.O., J.W. Gill, P.M. Arnow, and I. Magana-Plaza. Inhibition of the pleuropneumonia-like organism *Mycoplasma gallisepticum* by certain polyene antifungal antibiotics. *J. Bact.* 22, 945-949, 1963.
21. Manchee, R.J., and D. Taylor-Robinson. Studies on the nature of receptors involved in attachment of tissue culture cells to mycoplasmas. *Br.J.Exp.Path.* 50, 66-75, 1969.
22. Manchee, R.J., and D. Taylor-Robinson. Haemadsorption and haemagglutination by mycoplasmas. *J.gen.Microbiol.* 50, 465-478, 1968.

23. Marcus, M., U. Lavi, A. Nattenberg, S. Rottem, and O. Marcowitz. Selective killing of mycoplasmas from contaminated cells in cell cultures.
Nature 285, 659-660, 1980.
24. Meloni, G.A., G. Bertolini, F. Busolo, and L. Conventi. Localization of mycoplasma in cultured mammalian cells.
Microbiologica 4, 197-203, 1981.
25. Nègre, G., J. Schmitt-Slomska, and J. Roux. Effect of antibiotics on elimination of mycoplasma from experimentally infected cells.
Biomedicine 33, 61-62, 1980.
26. Niitu, J., S. Husegawa, T. Suctaka, H. Kubota, S. Komatsu, and M. Horikawa. Resistance of Mycoplasma pneumoniae to erythromycin and other antibiotics.
J. Pediat. 76, 438-443, 1970.
27. O'Malley, J.P., Z.A. McGee, M.F. Barile, and L.F. Berker. Identification of the A-1 agent as Mycoplasma gallisepticum.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 56, 895-901, 1966.
28. Paton, G.R., J.P. Jacobs, and F.T. Perkins. Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with mycoplasma.
Nature 207, 43-45, 1965.
29. Paul, J. Cells and tissue culture.
E. + S. Livingstone, Edinburgh and London, 4th ed. 1970.
30. Perez, A.G., J.H. Kim, A.S. Gelbard, and M. Djordjevic. Altered incorporation of nucleic acid precursors by mycoplasma-infected mammalian cells in culture.
Exp. Cell Res. 70, 301-310, 1972.

31. Polak - Vogelzang, A.A., R. Reygers, and F.E.N. Hekkens.
Isolation of Mycoplasma hyorhinitis and Mycoplasma fermentans from cell cultures.
J. Biol. Stand. 8, 243-254, 1980.
32. Raab, W. Mykosebehandlung mit Imidazolderivaten.
Springer-Verlag Berlin, 1978.
33. Razin, S. The mycoplasmas.
Microbiological Review 42, 414-470, 1978.
34. Razin, S., M. Banai, H. Gamliel, A. Polliack, W. Bredt, and I. Kahane. Scanning electron microscopy of mycoplasmas adhering to erythrocytes.
Infect. Immunity 30, 538-546, 1980.
35. Reynolds, R.K., and F.M. Hetrick. Potential use of surface-active agents for controlling mycoplasma contamination in animal cell cultures.
Appl. Microbiol. 17, 405-411, 1969.
36. Russel, W.C., C. Newmann, and D.H. Williamson.
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.
Nature 253, 461-462, 1975.
37. Schiefer, H.-G., U. Schummer, and U. Gerhard. Effect of cell membrane-active antimicrobial agents on membrane potential and viability of mycoplasmas.
Current Microbiology 3, 85-88, 1979.
38. Schimmelpfeng, L., U. Langenberg, and J.H. Peters.
Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro.
Nature 285, 661-662, 1980.

39. Schneider, E.L., and E.J. Stanbridge. Comparison of methods for the detection of mycoplasmal contamination of cell cultures: a review.
In vitro 11, 20-34, 1975.
40. Schreier, M., G. Köhler, H. Hengartner, C. Berek, C. Trucco, and L. Forni. Hybridome Techniques EMBO, SKMB course 1980, Basel, 63-64, 1980.
41. Smith, P.F. The biology of mycoplasmas.
Academic Press New York and London, 1971.
42. Stanbridge, E., M. Onen, R.T. Perkins, and L. Hayflick. Karyological and morphological characteristics of human diploid cell strain WI-38 infected with mycoplasmas.
Exptl. Cell Res. 57, 397-410, 1969.
43. Tully, J.G., and R.F. Whitcomb. The mycoplasmas II, human and animal mycoplasmas.
Academic Press New York, San Francisco, London, Vol. 2, 1979.
44. Windsor, R.S., and C.D.H. Boarer. A method for the rapid enumeration of mycoplasma species growing in broth culture.
J. Appl. Bact. 35, 37-42, 1972.
45. Wyler, R., A. Murbach, and H. Möhl. An imidazole-derivate (econazole) as an antifungal agent in cell culture system.
In vitro 15, 245-250, 1979.
46. Zucker-Franklin, D., M. Davidson, and T. Lewis. The interaction of mycoplasmas with mammalian cells.
J. Exp. Med. 124, 521-531, 1966.

7. VERDANKUNGEN

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas. Er hat meine Arbeit grosszügig unterstützt und mich in schwierigen Phasen aufgemuntert.

Herrn Prof. Dr. H.U. Bertschinger für die Uebernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. J. Nicolet, Bern, für die Ueberlassung der Mykoplasmen und deren Identifikation.

Herren Dres. F. Metzler und E. Peterhans für die technische Unterstützung.

Frl. Monika Heilmann für die Hilfe im Labor.

Frl. Ch. Gerber für die Niederschrift dieses Manuskriptes.

Fr. S. Pletscher und Fr. A. Hug für das Erstellen der grafischen Abbildungen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des virologischen Institutes für die moralische und technische Unterstützung.

8. LEBENSLAUF

Geboren am 22. März 1946 in Wattwil, SG, besuchte ich in Ganterschwil, SG, die Primar- und in Bütschwil, SG, die Sekundarschule.

1971 - 1974	Akademikergemeinschaft, Zürich
1974	Eidg. Maturität (Typus C)
1974 - 1979	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
1979 - 1980	Assistent in der Gemischtpraxis von Herrn B. Bötschi, Romanshorn
Seit Herbst 1980	Assistent am Institut für Virologie der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

